崇明拟异小杆线虫 *daf*-16 基因的功能鉴定

詹成修, 熊阳杰, 张 涛, 张克云*

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要:【目的】昆虫病原线虫(entomopathogenic nematodes, EPNs)的寿命和抗逆性是影响其商品化的重要因素。本研究旨在鉴定崇明拟异小杆线虫 *Heterorhabditidoides chongmingensis* 的模式品系 DZ0503CMFT(DZ)的 DAF-16 基因的生物学功能,探讨该基因在 DZ 线虫的寿命和抗逆性中的作用。【方法】根据 DZ 线虫和其自身共生菌 *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1^{T}(S1)及非自身共生菌 *S. nematodiphila* DR186(186)共培养时生长发育的差异,结合已经构建的 DZ 线虫的数字基因表达谱(digital gene expression profile, DGE)文库,选取调控生长发育的胰岛素/类胰岛素信号通路(insulin/insulin-like growth factor signaling pathway, IIS)的主要转录输出信号 DAF-16 作为研究对象。通过同源性分析选取 *daf*-16 基因中特异性片段作为干扰片段,利用 L4440 质粒载体构建干扰片段的 dsRNA 表达载体,并转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115(DE3)中。用饲喂法将 *daf*-16 dsRNA 导入 DZ 线虫体内沉默基因;利用实时定量 PCR 检测 RNA 干扰效果,统计 *daf*-16 基因表达下调后的 DZ 线虫寿命、4 个生理阶段的时长、抗逆性(热应激和氧化应激)以及表型(体长)和繁殖性状(48 h 内产卵量、卵孵化率和雌虫率)等的变化。【结果】DZ 线虫的 *daf*-16 (GenBank 登录号: MH101641) cDNA 全长 2 164 bp,其中开放阅读框(open reading frame, ORF)长 1 353 bp,编码 450 个氨基酸。RNAi 后 DZ 线虫体内的 *daf*-16 基因表达量被显著敲低,相对于对照组空载 L4440 降低了 49.05%。RNAi 组线虫平均寿命为 14.96 d,比空载 L4440 组(17.60 d)降低了 15.00%。DZ 线虫 *daf*-16 RNAi 组在繁殖阶段和快速身体运动阶段的时长比空载 L4440 组的短,而快速咽吸阶段和咽抽吸阶段的时长比空载 L4440 组的长。处理 7 d 后 DZ 线虫 *daf*-16 RNAi 组在热应激(37℃)和氧化应激(10 mmol/L 百草枯水溶液)处理时存活率显著低于 DZ 线虫的空载 L4440 组。在产卵量、孵化率、雌虫率和体长上 *daf*-16 RNAi 组与对照组之间没有显著差异。【结论】通过 RNAi 方法初步验证了 DZ 线虫的 *daf*-16 基因的生物学功能,该基因调控了崇明拟异小杆线虫的寿命和抗逆性。

关键词: 昆虫病原线虫; 崇明拟异小杆线虫; *daf*-16; RNAi; 寿命; 抗逆性

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)08-0932-09

Functional identification of *daf*-16 in *Heterorhabditidoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae)

ZHAN Cheng-Xiu, XIONG Yang-Jie, ZHANG Tao, ZHANG Ke-Yun* (College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:【Aim】Lifespan and stress resistance are two important factors that influence the commercial production of entomopathogenic nematodes (EPNs). This study aims to identify the function of DAF-16 gene in DZ0503CMFT (DZ), the type strain of *Heterorhabditidoides chongmingensis*, and to clarify the roles of the gene in the lifespan and stress resistance of DZ nematodes.【Methods】DAF-16, a major transcription factor of IIS pathway, was selected from digital gene expression profile (DGE) according to

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20131320); 国家自然科学基金项目(31470435)

作者简介: 詹成修, 男, 1991 年 12 月生, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向为抗虫生物及其活性物质资源, E-mail: 2015116049@njau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: keyunzhang@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-03-27; 接受日期 Accepted: 2018-05-23

differential development of two monoxenic DZ nematodes associated with different symbiotic bacterial strains of *Serratia*, *i. e.*, a non-native bacterial strain DR186 (186) and a native strain S1 of *S. nematodiphila*. The specific fragment of *daf*-16 was selected as the interference fragment by homology analysis, L4440 plasmid was used to construct the dsRNA expression vector of the interference fragment, and then the dsRNA expression vector of the interference fragment was transformed into *Escherichia coli* HT115 (DE3). *daf*-16 dsRNA was introduced into DZ nematode by feeding with the constructed engineering bacterium, and the effect of RNAi was detected by real-time quantitative PCR. The changes of the lifespan, spans of four physiological stages, stress resistance (heat stress and oxidative stress) and phenotype (body length) and reproduction characters (the number of eggs laid in 48 h, egg hatching rate and proportion of females) of DZ nematodes after *daf*-16 RNAi were observed and recorded. 【Results】 *daf*-16 (GenBank accession no.: MH101641) has a full-length cDNA of 2 164 bp with an open reading frame (ORF) of 1 353 bp in length, encoding 450 amino acids. After *daf*-16 RNAi in DZ nematodes, the expression level of *daf*-16 was significantly repressed with an average reduction of 49. 05% as compared with that of the control group (L4440 group) in qPCR assay. The average lifespan of DZ nematodes of the *daf*-16 RNAi group (14. 96 d) was reduced as compared with that of the L4440 group (17. 60 d), with a decrease of 15. 00%. Spans of the reproductive stage and fast body movement stage of DZ nematodes of the *daf*-16 RNAi group were shorter than those of the L4440 group, whereas the spans of the fast pharyngeal pumping stage and pharyngeal pumping stage of DZ nematodes of the *daf*-16 RNAi group were longer than those of the L4440 group. The survival rate of DZ nematodes of the *daf*-16 RNAi group was significantly lower than that of the L4440 group when the nematodes were exposed to heat stress (37℃) and oxidative stress (10 mmol/L paraquat solution) for 7 d. There was no significant difference in the number of eggs laid in 48 h, egg hatching rate, proportion of females and body length between the *daf*-16 RNAi group and the control group. 【Conclusion】 The biological functions of *daf*-16 in DZ nematode were identified by RNAi, which regulates the lifespan and stress resistance of DZ nematode.

Key words: Entomopathogenic nematode; *Heterorhabditidoides chongmingensis*; *daf*-16; RNAi; lifespan; stress resistance

昆虫病原线虫(entomopathogenic nematodes, EPNs)的致病性源自于其肠道内所携带的共生菌，二者互惠共生。EPNs 与其他昆虫寄生线虫主要有两方面的不同:EPNs 与共生细菌相关联以促进发病;EPNs 通常在感染之后的 72 h 内迅速杀死其宿主(Kaya and Gaugler, 1993; Triggiani and Cravedi, 2011; Dillman *et al*., 2012)。EPNs 作为一种新型生物防治因子,对控制部分鳞翅目、鞘翅目昆虫特别是钻蛀性以及土栖性害虫具有显著的成效。自 20 世纪 30 年代 Glaser 成功用斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 来控制日本丽金龟 *Popillia japonica* 种群数量以来,EPNs 的杀虫谱一直被不断扩充,从以前的荔枝龟背天牛 *Aristobia testudo*、迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga*、韭菜蕈蚊 *Bradysia odoriphaga*、香蕉扁黑象甲 *Odoiporus longicollis*、豆杆黑潜蝇 *Melanagromyza sojae* 等到如今的美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae*、白蚁(termites)及鳞翅目(Lepidoptera)和鞘翅目(Coleoptera)的部分昆虫等;甚至对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 也有很好的拮抗作用(Kaya and Gaugler, 1993; Hazir *et al*., 2004; Kepenekci *et al*., 2016; 王鑫鹏等, 2017)。EPNs 作为一种专一性强,效率高,并且环境友好型的生物防治因子,一直被广泛地关注和研究(Bai *et al*., 2009; Stock *et al*., 2009; Shapiro-Ilan *et al*., 2012; 吴文丹等, 2015)。随着 EPNs 商业化的大规模推广和运用,其在生物防治方面的优点越加明显,且发挥其致病效率的研究也越加深入(Gaugler *et al*., 2000)。同时 EPNs 在实际应用中受各种生物和非生物因子影响,导致对害虫的杀虫效果变差,EPNs 的寿命和逆境抗性是影响其商品化的重要因素(Shapiro *et al*., 2006)。Hashmi 等(1998)将热休克基因 *hsp*70 从秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 引入到嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 是首次成功制备转基因 EPNs 的尝试,该基因的转入导致嗜菌异小杆线虫的

耐热能力显著增强。近年来,随着实验技术和设备支持的进步,通过对 EPNs 生长发育相关基因和代谢通路的调控,优化其生物杀虫效率的研究吸引了广大学者的关注(Hashmi *et al*., 1995; Strauch *et al*., 2004; Ratnappan *et al*., 2016; Yaari *et al*., 2016)。

崇明拟异小杆线虫 *Heterorhabditidoides chongmingensis* DZ0503CMFT(DZ)是一种与嗜线虫沙雷氏菌 *Serratia nematodephila* DZ0503SBS1^T(S1)特异性共生的 EPNs (Zhang *et al*., 2008, 2009)。王莹(2013)研究发现,DZ 线虫与非自身嗜线虫沙雷氏菌菌株 DR186(186)共培养时,单菌线虫组合 DZ/186 的寿命、成虫的发育速率和性比等显著低于 DZ/S1。陈龙(2015)构建分析了 2 组单菌线虫组合 DZ/S1 和 DZ/186 的数字基因表达谱(digital gene expression profile, DGE),对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的富集通路分析表明胰岛素信号通路(insulin/insulin-like growth factor pathway, IIS)中相关基因显著富集。从 DZ 线虫转录组基因表达谱(DGE)文库中发现存在与哺乳动物中调控 IIS 通路的 FOXO 转录因子家族同源的基因,而在秀丽隐杆线虫中也存在该基因,被命名为 *daf*-16。DAF-16 是 IIS 的主要转录输出信号,*daf*-16 基因突变后,秀丽隐杆线虫的寿命和抗逆性会受到影响(Boulias and Horvitz, 2012; Warnhoff *et al*., 2014)。因此,研究崇明拟异小杆线虫 *daf*-16 基因的功能,为进一步明确该线虫生长发育以及抗逆性的分子机制提供理论基础,也为崇明拟异小杆线虫以及其他 EPNs 的开发利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验样品与主要试剂

实验用 DZ 线虫是南京农业大学生命科学学院动物生物学系鉴定保存的崇明拟异小杆线虫 *H. chongmingensis* 模式品系 DZ0503CMFT。野生型 DZ 线虫用末龄大蜡螟 *Galleria mellonella* 进行培养传代,单菌型 DZ 线虫用液体线虫生长培养基(NGM)进行培养(Brenner, 1974)。DZ 线虫和其自身共生菌 *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1^T(S1)及非自身共生菌 *S. nematodiphila* DR186(186)两种单菌线虫 DZ/S1 和 DZ/186 的 DGE 和 DEGs 表达谱文库来自南京农业大学生命科学学院动物生物学系高通量测序(陈龙, 2015)。

Trizol 总 RNA 提取试剂、限制性内切酶 *Hin*dⅢ和 *Pst* Ⅰ、普通 DNA Taq 酶预混液(2 × Taq PCR MasterMix)、DL2000™ DNA Marker、DL2502™ DNA Marker、T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司;SuperQuick RT MasterMix、UltraSYBR Mixture 购自康为世纪生物公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Axygen 生物公司;百草枯购自南京寿德试剂器材有限公司。

1.2 DAF-16 氨基酸序列分析及 RNAi 载体构建

根据 DZ 线虫和其自身共生菌 *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1^T(S1)及非自身共生菌 *S. nematodiphila* DR186(186)共培养时生长发育的差异(王莹, 2013),结合已经构建的 DZ 线虫的 DGE 文库(陈龙, 2015),选取调控生长发育的胰岛素信号通路(insulin/insulin-like growth factor signaling pathway, IIS)的主要转录输出信号 DAF-16 作为研究对象。收集野生 DZ 线虫约 10 000 条,使用 MiniBEST 通用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)分别提取总 RNA,使用 HiFiScript cDNA 合成试剂盒(CWBIO)反转录为 cDNA。DZ 线虫 DAF-16 氨基酸序列与 NCBI 数据库比对,选取比对结果中 14 个一致性最高的线虫 FOXO 转录因子家族的氨基酸序列利用 MAGA 6.0 进行序列比对并采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)(1 000 次抽样分析)进行系统进化树分析。通过 DAF-16 氨基酸序列的同源性比对后,选取其同源性较好的序列作为目的序列,用 Primer 5.0 设计 RNAi 干扰片段,在 RNAi 干扰片段两端添加 *Hin*dⅢ/*Pst* Ⅰ酶切位点(下划线标注)设计引物:daf-16 F:5′-CCAAGCTTGGCACCCAAGAAAAAA-3′; daf-16 R:5′-GCTGCAGCTCCAGCACGAGAAC-3′。PCR 反应体系(40 μL):cDNA 模板 1 μL,上/下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,2 ×Taq Master mix 20 μL,补充水至总体系 40 μL。PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,45℃ 45 s 和 72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 5 min,扩增片段长 554 bp。PCR 产物连接 T-Vector pMD19(Simple)并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态,阳性克隆载体转化子的质粒提取经双酶切连接到载体 L4440 质粒并转化到大肠杆菌 HT115(DE3)并扩增。

1.3 单菌线虫的制备与培养

根据 Han 和 Ehlers(1998)的方法并加以改进获得无菌线虫。取大蜡螟活体培养的 DZ 怀卵大母虫用硫柳汞溶液(0.1%, w/v)浸泡约 30 min,用无菌林格溶液(100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L HEPES, 2 mmol/L $CaCl_2$, 1.8 mmol/L KCl 和 1 mmol/L $MgCl_2$,

pH 6.9）清洗 2 次。清洗后的线虫浸泡在 0.4 mol/L NaOH 中（加入 2.5% 次氯酸钠至最终浓度为 2.5%），充分摇动或旋转约 10 min 以杀死这些大母虫并释放卵子。用无菌林格溶液冲洗 2 次并转移到"肝-琼脂"平板上，并在 25℃温育，孵育 3 d 后，实验用线虫可从这些平板获得同步的无菌 DZ 侵染期幼虫（infective juveniles，IJs）。

喂饲法制备 RNAi 处理的 DZ 线虫。参考 Tabara 等（1998）和 Timmons 等（2001）的方法并加以修改，使用终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导处理过夜培养的 1.2 节制备的 HT115（DE3）-L4440-*daf*-16 质粒菌液 6 h；然后在 24 孔细胞培养板中每孔加入 120 μL 的诱导菌液与无菌 DZ IJs 线虫共培养，即 *daf*-16 RNAi 组，对照组（L4440 组）用等量的 HT115（DE3）-L4440 质粒菌 IPTG 诱导菌液与无菌线虫共培养。

1.4　RNAi 后 DZ 线虫中 *daf*-16 基因的表达分析

daf-16 RNAi 组（每孔一条）与 L4440 对照组（每孔一条）线虫培养 7 d 后分别收集两组线虫各约 150 条，使用 MiniBEST 通用 RNA 提取试剂盒（TaKaRa）分别提取总 RNA，使用 HiFiScript cDNA 合成试剂盒（CWBIO）反转录为 cDNA，使用 UltraSYBR Mixture（CWBIO）评估 cDNA 质量。使用 Primer Premier 5.0 软件（PREMIER Biosoft International，美国）设计基因序列特异性引物，daf-16 F：5′-CCTCCCTGGGTCGATTCCT-3′；daf-16 R：5′-GGCCACTGGCTCCGTCTTA-3′。以 DZ 线虫 18S rRNA 为内参基因，设计引物 18S F：5′-CATCCAAGGAAGGCAGCAGG-3′；18S R：5′-CCGCAGCAATGACGATTTACAC-3′。使用 Applied Biosystems（ABI）Prism 7300 序列检测系统进行 qPCR 分析，反应体系（20 μL）：cDNA 模板 0.5 μL，上/下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，2 × UltraSYBR Mixture 10 μL，补充水至总体系 20 μL。反应条件：95℃ 10 min；接着 40 个循环，95℃ 15 s 和 60℃ 1 min，3 次生物学重复，3 组技术重复。使用自动基线确定功能确定适当的循环阈值（Ct），并通过相对定量分析方法分析数据。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量法（相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$；$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ 实验组 $- \Delta C_T$ 空载组）计算每组 *daf*-16 的相对表达倍数。使用 GraphPad Prism 5 进行 Student 氏 *t* 检验和作图。

1.5　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫寿命和相关生理阶段时长的影响

寿命测定参考 Pietsch 等（2009）方法并进行修改。将 *daf*-16 RNAi 组（每孔一条）与 L4440 组（每孔一条）25℃培养，无菌 DZ IJs 线虫的阶段被定义为寿命测定中的 0 d，并每天监测一次直至死亡。将线虫每 2 d 转移到新鲜的相应菌株液体 NGM 的 24 孔板上。当线虫不再对轻微的头部刺激作出反应时即可认为死亡。寿命测定进行 3 组（n = 30），3 次生物学重复。将获得数据用 GraphPad Prism 5 进行 Log Rank（Mantel-Cox）分析检测和作图。

繁殖阶段（Ⅰ）、快速身体运动阶段（Ⅱ）、快速咽吸阶段（Ⅲ）和咽抽吸阶段（Ⅳ）的时长变化分析参考 Huang 等（2004）并进行修改。在测定繁殖阶段时每孔放 2 条无菌 DZ IJs 线虫以获得的生殖线虫之外，其余各个阶段时长的测定每孔放一条无菌 DZ IJs 线虫培养。检测线虫的下列表型：（1）在液体 NGM 24 孔板上的生殖结束的时间；（2）观察 10 s，如果试验线虫在 10 s 内运动距离大于 1 mm 时表现出连续和协调的运动，则被定义为快速运动；（3）通过在 10 s 间隔内观察咽部收缩的次数来评估咽部抽吸。线虫每 10 s 抽吸次数为 0 时被认为寿命结束，抽吸次数在 1 ~ 24 被认为慢速咽吸阶段，抽吸次数大于 24 则被认为快速咽吸阶段。所有指标都是从同期的线虫中观察到的。Ⅰ - Ⅳ各生理阶段的时长变化分析进行 3 组（n = 30），3 次生物学重复。将获得数据用 GraphPad Prism 5 进行作图。

1.6　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫热应激和氧化应激的影响

参考 Li 等（2008）的方法检测 *daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫热应激（37℃）和氧化应激（10 mmol/L 百草枯水溶液）的影响。将 *daf*-16 RNAi 组（每孔一条）与 L4440 组（每孔一条）培养 7 d 后收集单菌线虫并用无菌林格试剂冲洗两次，分别转入 200 μL 每孔的无菌林格溶液的 24 孔板上（每孔 5 ~ 6 条），37℃下测定热应激以及 25℃下每孔 200 μL 百草枯溶液（10 mmol/L）的氧化应激。每 3 h 记录并统计存活的线虫的个体数。实验设置 3 组（n = 30），3 次生物学重复。将获得数据用 GraphPad Prism 5 进行 Log Rank（Mantel-Cox）分析检测和作图。

1.7　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫产卵量、卵孵化率、雌虫率和体长的影响

参考 Maule 等（2011）和 Piano 等（2000）的方法并加以修改。*daf*-16 RNAi 组与 L4440 组每孔加入 2 条无菌 DZ IJs 线虫，线虫开始产卵后每隔 24 h 将各孔内的线虫转移到新孔中培养并记录产卵开始后 48 h 内线虫的产卵量。收集的线虫卵培养 2 d 后统

计线虫卵发育为线虫的情况，计算线虫卵孵化的百分率（卵孵化率）。实验设置每组统计 10 条产卵线虫，3 次生物学重复。*daf*-16 RNAi 组与 L4440 组每孔加入一条无菌 DZ IJs 线虫并开始计时，培养 5 d 后观察繁殖性状，计算雌虫率，实验设置 3 组重复（n = 30）。*daf*-16 RNAi 组与 L4440 组每孔加入一条无菌 DZ IJs 线虫，每隔 12 h 吸取 6 条 DZ 线虫进行体长测定并记录，直至各组 DZ 线虫体长不再发生变化，3 次生物学重复。将获得数据用 GraphPad Prism 5 进行作图，48 h 内产卵量和体长用单因素方差分析，雌虫率和卵孵化率经平方根反正弦转换后用 SPSS17.0 进行分析。

2 结果

2.1 DAF-16 系统发生分析

DZ 线虫的 *daf*-16 的 cDNA 序列全长 2 164 bp，其中开放阅读框长 1 353 bp，终止密码子为 TAG，编码 450 个氨基酸。氨基酸序列 BLAST 比对结果显示，DZ 线虫 DAF-16 与其他线虫的 DAF-16 氨基酸序列有较高的保守性。其中，DZ 线虫 DAF-16（GenBank 登录号：MH101641）与广州管圆线虫 *Angiostrongylus cantonensis* 的 DAF-16b（GenBank 登录号：AOR50894.1）相似性最高，氨基酸序列一致性为 65%；与楔齿锯齿线虫 *Pristionchus pacificus* 的 DAF-16（GenBank 登录号：PDM75905.1）、秀丽隐杆线虫的 FOXO（GenBank 登录号：NP_001021593.1）和 *Caenorhabditis remanei* 的 DAF-16（GenBank 登录号：XP_003115058.1）的氨基酸序列一致性均为 61%（图 1）。利用 MAGA 6.0 构建基于 DZ 线虫 DAF-16 和 BLAST 比对结果同源性较高的 14 种其他线虫 DAF-16 氨基酸序列的系统发育树（图 2），进化分析表明 DZ 线虫 DAF-16 属于 FOXO 转录因子家族。

2.2 RNAi 干扰效果

收集培养 7 d 的两组线虫，以 18S rRNA 作为内参基因，结果显示 *daf*-16 RNAi 组线虫 *daf*-16 基因表达水平显著低于 L4440 组（$P = 4.29 \times 10^{-7}$），抑制率为 49.05%（图 3）。

```
               *  *    *  *  *   * *      **         ************************************ * *******
Aci-DAF-16     ITQAIMQSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRVR--ASTLD
Act-DAF-16a    ITQAIMQSPDKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRVR--ASTLD
Act-DAF-16b    IAKALESAPEGRLKLNEIYQWFSDNIPYFRERSSQEDAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRVR--ASTLD
Ace-DAF-16     ITQAIMQSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRVR--ASTLD
Bma-DAF-16a    ITQAIVSSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRQR--SATLE
Bma-DAF-16b    ITQAIVSSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRQR--SATLE
Bxy-DAF-16-1   IAKALESAPGGRMKLNEIYQWFSDNVPYFKERSSQEHAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRRS---ATME
Cbr-DAF-16     ISTAINASPEKRLTLAQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPEAKPGRNPRRTRERSNTIE
Cel-DAF-16     IAKALESAPDGRLKLNEIYQWFSDNIPYFGERSSPEEAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRTRERSNTIE
Cre-DAF-16     IAKALESAPDGRLKLNEIYQWFSDNIPYFRERSSQEEAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPEAKPGRNPRRTRERSNTIE
DZ-DAF-16      IARALESAPEGRLKLNEIYQWFSDNIPYFRERSSQEEAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRAR--ASTMD
Hco-DAF-16a    ITQAIMQSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAIPGRNPRRVR--ASTLD
Hco-DAF-16b    ITQAIMQSPEKRLTLSQVYEWMVQNVPYFRDKGDSNSSAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRVR--ASTLD
Ppa-DAF-16     IAKALESSPDGRLKLNEIYQWFSDHVQYFRERSSQEEAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRTR--ATTMD
Tca-DAF-16     IAKALECAPEKRMKLNEIYQWFSANIAYFRERSSAEEAAGWKNSIRHNLSLHSRFMRIQNEGAGKSSWWVINPDAKPGRNPRRQR--SATLE
```

图 1 DZ 线虫与其他昆虫 DAF-16 蛋白保守域同源序列比对

Fig. 1 Conserved domain sequence alignment of DAF-16 homologous proteins of DZ nematodes and other insects

星号表示保守位点 The conserved sites are indicated with the asterisk. 蛋白质来源及 GenBank 录号 Origin species of proteins and their GenBank accession numbers：Aci-DAF-16：犬钩虫 *Ancylostoma caninum*，ACD85816.1；Act-DAF-16a，Act-DAF-16b：广州管圆线虫 *Angiostrongylus cantonensis* AOR50893.1，AOR50894.1；Ppa-DAF-16：楔齿锯齿线虫 *Pristionchus pacificus*，PDM75905.1；Cel-DAF-16：秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*，NP_001021593.1；Cre-DAF-16：*Caenorhabditis remanei*，XP_003115058.1；Tca-DAF-16：犬弓首蛔虫 *Toxocara canis*，KHN81281.1；Ace-DAF-16：锡兰钩口线虫 *Ancylostoma ceylanicum*，ACD85815.1；Hco-DAF-16a，Hco-DAF-16b：捻转血矛线虫 *Haemonchus contortus*，CBA10134.1，CBA10135.1；Cbr-DAF-16：*Caenorhabditis briggsae*，XP_002640298.1；Bma-DAF-16a，Bma-DAF-16b：马来丝虫 *Brugia malayi*，CDQ02878.2，CTP81885.1；Bxy-DAF-16-1：松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*，ADD84715.1. 下同 The same below.

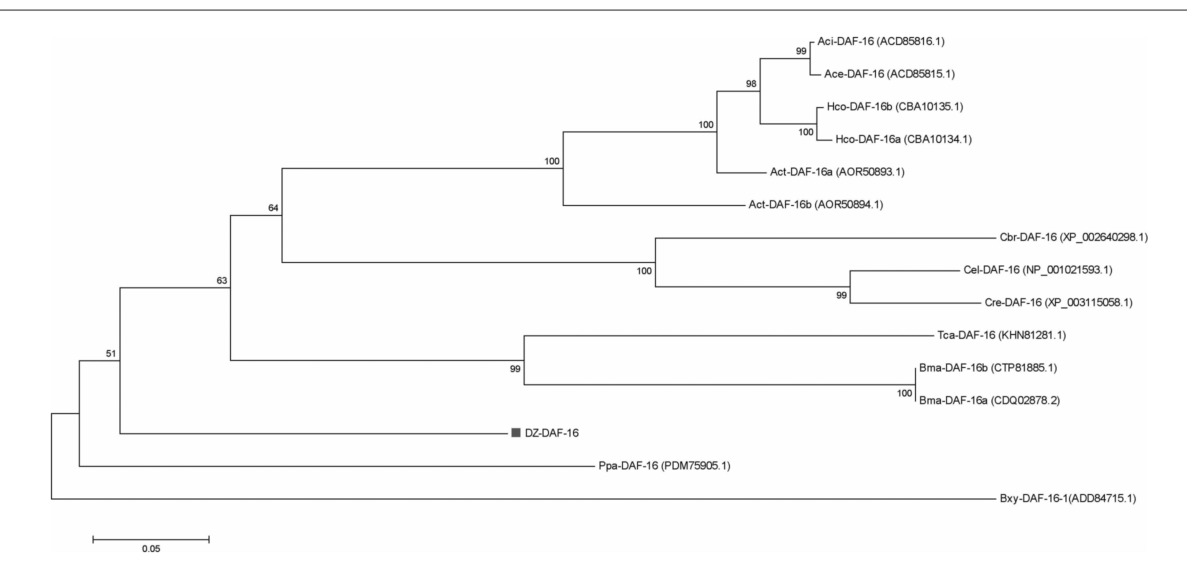


图 2　基于 DAF-16 氨基酸序列构建的 DZ 线虫与其他昆虫系统进化树（邻接法，1 000 次重复）
Fig. 2　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of DAF-16 proteins from DZ nematodes and other insects (neighbor-joining method, 1 000 replicates)
以 0.05 为遗传距离作为标尺。The genetic distance of 0.05 is used as the scale bar.

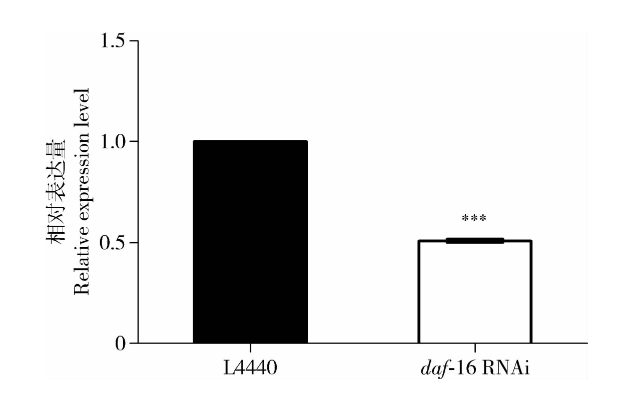


图 3　RNAi 后 DZ 线虫 *daf*-16 表达量的变化
Fig. 3　Relative expression level of *daf*-16 in DZ nematodes after RNAi
L4440：对照组 Control group；*daf*-16 RNAi：*daf*-16 RNAi 组 *daf*-16 RNAi group. 18S rRNA 作为内参基因；图中数据为平均值 ± *SD*；差异显著性用 Student 氏 *t* 检测检测进行分析。18S rRNA was set as the internal reference to determine the relative expression level, which is normalized to the level of the L4440 group. Data in the figure are mean ± *SD*. The significance between different treatment was tested by Student's *t*-test. *** $P<0.001$.

2.3　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫寿命和相关生理阶段时长的影响

daf-16 RNAi 后，*daf*-16 RNAi 组 DZ 线虫寿命显著低于 L4440 组 DZ 线虫寿命。L4440 组的 DZ 线虫最长存活时间（25 d）高于 *daf*-16 RNAi 组的最长存活时间（22 d）；DZ 线虫的平均寿命由 L4440 组的 17.60 d 降低为 *daf*-16 RNAi 组的 14.96 d，降低 15.00%（图 4：A）。表明抑制 *daf*-16 基因的表达显著降低了 DZ 成虫的寿命（$P<0.0001$）。

观察 *daf*-16 RNAi 组与 L4440 组线虫并统计各组线虫 4 个生理阶段时长的变化。结果显示 L4440 组 DZ 线虫阶段Ⅰ－Ⅳ时长分别为 6.67，6.94，1.32 和 2.22 d，*daf*-16 RNAi 组阶段Ⅰ－Ⅳ时长分别为 5.34，3.32，3.18 和 5.07 d，表明 *daf*-16 RNAi 组的 DZ 线虫较对照组在阶段Ⅰ和阶段Ⅱ的时长缩短，而在阶段Ⅲ和阶段Ⅳ的时长延长（图 4：B）。

2.4　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫抗逆性的影响

收集 *daf*-16 RNAi 组与 L4440 组每孔各加一条无菌 DZ IJs 线虫培养 7 d 后的 DZ 线虫，分别进行热应激（37℃）和氧化应激（10 mmol/L 百草枯水溶液）实验。结果显示 *daf*-16 RNAi 组线虫在热应激和氧化应激处理时存活率均显著低于 L4440 组线虫。DZ 线虫在热应激处理时的存活时间的中位数由 L4440 的 15 h 降低为 *daf*-16 RNAi 组的 12 h（图 5：A）；DZ 线虫在氧化应激处理时的存活时间的中位数由 L4440 组的 12 h 降低为 *daf*-16 RNAi 组的 9 h（图 5：B）。说明抑制 *daf*-16 基因的表达显著降低了 DZ 成虫的抗热应激和抗氧化应激的能力（$P=0.0017$；$P=0.0233$）。

2.5　*daf*-16 RNAi 对 DZ 线虫体长、48 h 内产卵量、卵孵化率和雌虫率的影响

观察并统计 *daf*-16 RNAi 组与 L4440 组线虫的表型和繁殖性状变化。DZ 线虫开始产卵后 48 h 内的产卵量统计结果显示，*daf*-16 RNAi 组平均为 143 粒，L4440 组平均为 139 粒（图 6：A），各组产卵量

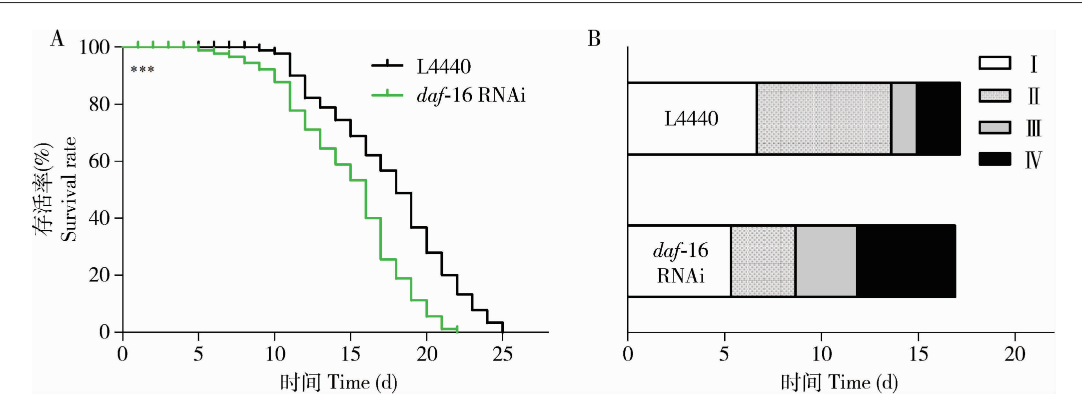


图 4 *daf*-16 RNAi 后 DZ 线虫寿命(A)和生理阶段时长(B)的变化

Fig. 4 Lifespan (A) and spans of physiological stages (B) of DZ nematodes after *daf*-16 RNAi

L4440：对照组 Control group；*daf*-16 RNAi：*daf*-16 RNAi 组 *daf*-16 RNAi group. Ⅰ：繁殖阶段 Reproductive stage；Ⅱ：快速身体运动阶段 Fast body movement stage；Ⅲ：快速咽吸阶段 Fast pharyngeal pumping stage；Ⅳ：咽抽吸阶段 Pharyngeal pumping stage. *daf*-16 RNAi 组和对照组之间寿命的差异显著性用 Log Rank (Mantel-Cox) test 检测进行分析。The significance of difference in the lifespan between the *daf*-16 RNAi group and the control group was tested by LogRank (Mantel-Cox) test. *** $P<0.001$.

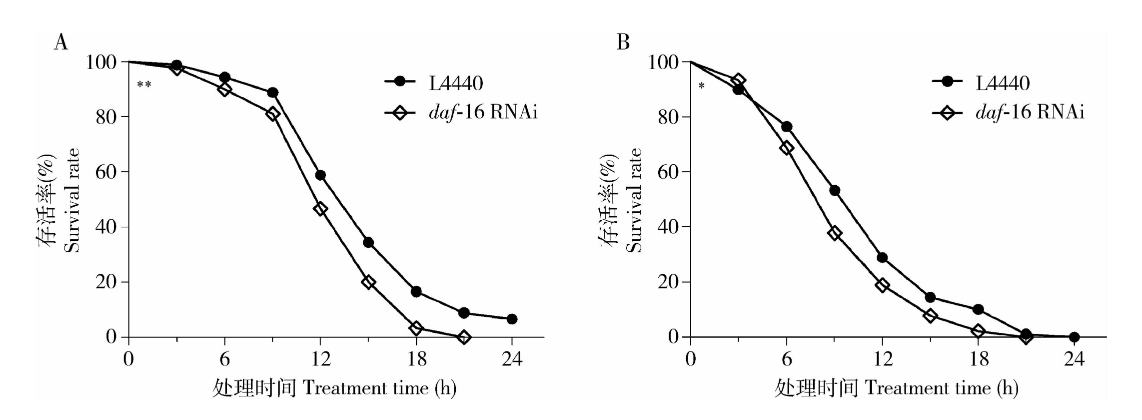


图 5 *daf*-16 RNAi 后 DZ 线虫抗逆性的变化

Fig. 5 The stress resistance of DZ nematodes after *daf*-16 RNAi

A：热应激 Heat stress (37℃)；B：氧化应激(10 mmol/L 百草枯水溶液)Oxidative stress (10 mmol/L paraquat solution). L4440：对照组 Control group；*daf*-16 RNAi：*daf*-16 RNAi 组 *daf*-16 RNAi group. *daf*-16 RNAi 组和对照组间存活率的差异显著性用 Log Rank (Mantel-Cox) test 检测进行分析。The significance of difference in the survival rate between the *daf*-16 RNAi group and the control group was tested by Log Rank (Mantel-Cox) test. ** $P<0.01$；* $P<0.05$.

之间没有显著性差异($P=0.8052$)。*daf*-16 RNAi 组线虫所产的虫卵的孵化率(91.67%)与 L4440 组(91.68%)之间没有显著性差异(图 6：B)($P=0.7995$)。*daf*-16 RNAi 组成虫雌虫率(55.56%)与 L4440 组(57.78%)没有显著性差异(图 6：C)($P=0.6206$)。*daf*-16 RNAi 组的体长与 L4440 组在培养 0 h($P=0.2314$), 12 h($P=0.1251$), 24 h($P=0.5769$), 36 h($P=0.6806$), 48 h($P=0.6751$), 60 h($P=0.8932$), 72 h($P=0.9967$), 84 h($P=0.8120$)和 96 h($P=0.8604$)不存在显著差异(图 6：D)。说明 DZ 线虫抑制 *daf*-16 基因表达后其表型和繁殖性状的没有发生显著变化。

3 讨论

EPNs 作为一种在欧美国家被广泛应用的生物杀虫剂,其商品化潜力和杀虫效率的研究一直是研究的重点(Lacey *et al*., 2015)。EPNs 通过与细菌的共生来杀死节肢动物宿主。EPNs 的 IJs 通过宿主的自然开口进入其血腔内释放共生菌并杀死宿主,IJs 线虫在外界条件不适合生长发育时会进入滞育状态从而增加线虫的寿命和抗逆性(Narayanan, 2004)。本研究结果表明,小杆科昆虫病原线虫 DZ 与其共生菌共生相关的 *daf*-16 基因与 DZ 线虫的寿命和抗

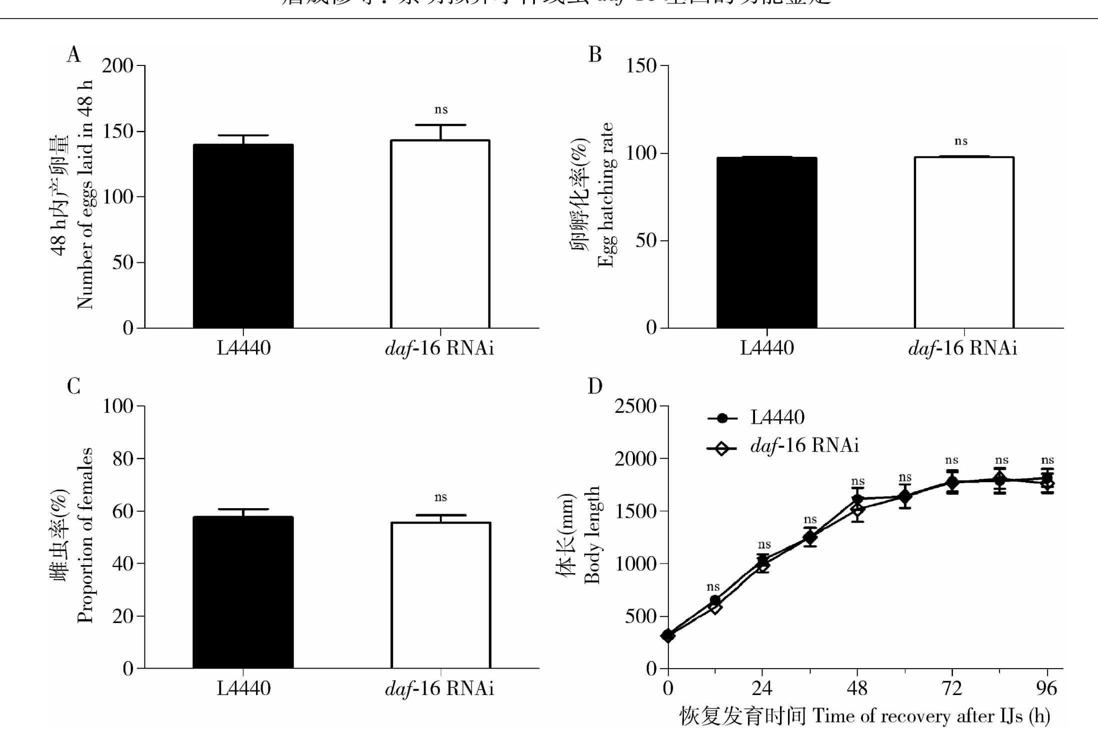


图 6 *daf*-16 RNAi 后 DZ 线虫的发育情况

Fig. 6 The development of DZ nematodes after *daf*-16 RNAi

A：48 h 内产卵量 Number of eggs laid in 48 h；B：卵孵化率 Egg hatching rate；C：雌虫率 Proportion of females；D：体长 Body length. IJs：侵染期幼虫 Infective juveniles；L4440：对照组 Control group；*daf*-16 RNAi：*daf*-16 RNAi 组 *daf*-16 RNAi group. 图中数据为平均值 ± *SD*；图中 ns 表示 *daf*-16 RNAi 组和对照组间数据没有显著性差异（$P > 0.05$）。Data in the figure are mean ± *SD*. ns indicates no significant difference between the *daf*-16 RNAi group and the control（$P > 0.05$）.

逆性相关。本研究发现 *daf*-16 基因表达下调后，DZ 线虫寿命变短且抗逆性减弱。Ghazi 等（2007）的研究结果也证明，秀丽隐杆线虫中 *daf*-16 RNAi 会显著降低秀丽隐杆线虫的寿命和应激抗性，说明 *daf*-16 在 DZ 线虫和秀丽隐杆线虫中均参与调控线虫的寿命和应激性。

在秀丽隐杆线虫中调控寿命和抗逆性的途径主要有 IIS 和 mTOR 等信号途径，其中主要包括 DAF，INS，IST-1，PDK-1，AGE-1 和 AKT 等关键因子的相关基因。本研究证明转录因子 DAF-16 参与调控 DZ 线虫的寿命与抗逆性，但该因子在 DZ 线虫的寿命和抗逆性相关的调控网络中如何作用，及其该基因在 DZ 线虫与共生菌共生相关的调控网络中如何作用等仍不清楚。因此，DZ 线虫与寿命、抗逆性和其共生菌共生的相关基因的的分子调控机制仍需要进行进一步探索，对其调控网络的深入认识将可为 DZ 线虫的商品化运用提供理论基础。并对其他 EPNs 的相关基因功能的研究，以及运用生物技术方法改善 EPNs 的杀虫效率促进其商品化提供依据。

参考文献（References）

Bai XD, Saeb ATM, Miche l, Grewal PS, 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Mol. Ecol. Resour*., 9(1)：207－209.

Boulias K, Horvitz HR, 2012. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab*., 15(4)：439－450.

Brenner S, 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1)：71－94.

Chen L, 2015. Digital Gene Expression Profiling and Research of Symbiosis Related Genes Enriched Pathways Analysis of *Heterorhabditidoides chongmingensis* Associated with *Serratia nematodiphila* Strains. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing.［陈龙，2015. 崇明拟异小杆线虫与嗜线虫沙雷氏菌共生的基因表达谱及共生相关基因富集通路的研究. 南京：南京农业大学硕士学位论文］

Dillman AR, Chaston JM, Adams BJ, Ciche TA, Goodrich-Blair H, Stock SP, Sternberg PW, 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathog*., 8(3)：e1002527.

Gaugler R, Grewal P, Kaya HK, Smith-Fiola D, 2000. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 17(1)：100－109.

Ghazi A, Henis-Korenblit S, Kenyon C, 2007. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by a proteasomal E3 ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(14)：5947－5952.

Han RC, Ehlers RU, 1998. Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp. dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica*, 44(4)：425－435.

Hashmi S, Hashmi G, Gaugler R, 1995. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *J. Invertebr. Pathol.*, 66(3): 293 – 296.

Hashmi S, Hashmi G, Glazer I, Gaugler R, 1998. Thermal response of *Heterorhabditis bacteriophora* transformed with the *Caenorhabditis elegans hsp*70 encoding gene. *J. Exp. Zool.*, 281(3): 164 – 170.

Hazir S, Kaya HK, Stock SP, Keskin N, 2004. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turk. J. Biol.*, 27(4): 181 – 202.

Huang C, Xiong CJ, Kornfeld K, 2004. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(21): 8084 – 8089.

Kaya HK, Gaugler R, 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38(1): 181 – 206.

Kepenekci I, Hazir S, Lewis EE, 2016. Evaluation of entomopathogenic nematodes and the supernatants of the *in vitro* culture medium of their mutualistic bacteria for the control of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Pest Manag. Sci.*, 72(2): 327 – 334.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.*, 132(11): 1 – 41.

Li J, Ebata A, Dong YQ, Rizki G, Iwata T, Lee SS, 2008. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a *daf*-16 regulator. *PLoS Biol.*, 6(9): e233.

Maule AG, McVeigh P, Dalzell JJ, Atkinson L, Mousley A, Marks NJ, 2011. An eye on RNAi in nematode parasites. *Trends Parasitol.*, 27(11): 505 – 513.

Narayanan K, 2004. Inseet defence: its impact on microbial control of insect pests. *Curr. Sci.*, 86(6): 800 – 814.

Piano F, Schetter AJ, Mangone M, Stein L, Kemphues KJ, 2000. RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 10(24): 1619 – 1622.

Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CEW, 2009. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age*-1, *daf*-2, *sek*-1 and *unc*-43. *Biogerontology*, 10(5): 565 – 578.

Ratnappan R, Vadnal J, Keaney M, Eleftherianos I, O′Halloran D, Hawdon JM, 2016. RNAi-mediated gene knockdown by microinjection in the model entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasit. Vectors*, 9(1): 1 – 9.

Shapiro-Ilan DI, Gouge GH, Piggott SJ, Patterson FJ, 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control*, 38(1): 124 – 133.

Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Campbell JF, Kim-Shapiro DB, 2012. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(1): 34 – 40.

Stock SP, Rivera-Orduno B, Flores-Lara Y, 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp., a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) in the Sonoran desert. *J. Invertebr. Pathol.*, 100(3): 175 – 184.

Strauch O, Oestergaard J, Hollmer S, Ehlers RU, 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biol. Control*, 31(2): 218 – 226.

Tabara H, Grishok A, Mello CC, 1998. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282(5388): 430 – 431.

Timmons L, Court DL, Fire A, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1): 103 – 112.

Triggiani O, Cravedi P, 2011. Entomopathogenic nematodes. *Curr. Biol.*, 94(11): 119 – 122.

Wang XP, Wang CL, Li CJ, 2017. Effect of symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes on egg hatching of *Meloidogyne incognita*. *Soils Crops*, 6(4): 256 – 262. [王鑫鹏, 王从丽, 李春杰, 2017. 昆虫病原线虫共生细菌对南方根结线虫卵孵化的影响. 土壤与作物, 6(4): 256 – 262]

Wang Y, 2013. Symbiotic Specialization, Stability and Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes of *Heterorhabdiyidoides* and Their Symbiotic Bacterial Strains. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [王莹, 2013. 拟异小杆类昆虫病原线虫与其共生菌共生专化性、稳定性及其致病性研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Warnhoff K, Murphy JT, Kumar S, Schneider DL, Peterson M, Hsu S, Guthrie J, Robertson JD, Kornfeld K, 2014. The DAF-16 FOXO transcription factor regulates *natc*-1 to modulate stress resistance in *Caenorhabditis elegans*, linking insulin/IGF-1 signaling to protein N-terminal acetylation. *PLoS Genet.*, 10(10): e1004703.

Wu WD, Sun HY, Xi JH, Yin J, Zhang S, Cao YZ, 2015. Observations of the ultrastructure of the fat body and midgut tissues of two white grub species, *Holotreichia parallela* and *H. ablita* (Coleoptera: Melolonthidae) infected by entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Acta Entomol. Sin.*, 58(8): 836 – 845. [吴文丹, 孙昊雨, 席景会, 尹姣, 张帅, 曹雅忠, 2015. 嗜菌异小杆线虫侵染后暗黑鳃金龟和大黑鳃金龟幼虫脂肪体和中肠组织超微结构观察. 昆虫学报, 58(8): 836 – 845]

Yaari M, Doron-Faigenboim A, Koltai H, Salame L, Glazer I, 2016. Transcriptome analysis of stress tolerance in entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. *Int. J. Parasitol.*, 46(2): 83 – 95.

Zhang CX, Liu JR, Xu MX, Sun H, Yang SY, An XH, Gao GF, Lin MS, Lai R, He ZY, Wu YD, Zhang KY, 2008. *Heterorhabditidoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 98(2): 153 – 168.

Zhang CX, Yang SY, Xu MX, Sun J, Liu H, Liu JR, Liu H, Kan F, Sun J, Lai R, Zhang KY, 2009. A novel species of *Serratia*, family Enterobacteriaceae: *Serratia nematodiphila* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59(7): 1603 – 1608.

(责任编辑: 马丽萍)